

機能性ポリペプチド材料の開発

杉山信之^{*1}、木村與司雄^{*1}、角田有紀^{*1}、近藤徹弥^{*1}、近藤正夫^{*2}

Development of Functional Polypeptide Materials

Nobuyuki SUGIYAMA, Yoshio KIMURA, Yuki KAKUDA, Tetsuya KONDO
and Masao KONDO

Food Research Center, AITEC^{*1*2}

納豆菌の生産する粘質物質の主成分であるポリグルタミン酸 (PGA) をアルミニウムイオンあるいはキトサンと複合化することで水に不溶性の物質とすることができた。これらの沈殿物は、加える陽イオンやキトサンの濃度が高いほど多かった。また、沈殿物中のアルミニウム含有量は、沈殿生成時のアルミニウム濃度に比例して増加した。一方、キトサンで沈殿させた物質についてはキトサン濃度に依存せず、キトサンと PGA が同じ割合で沈殿していることが判明した。

1. はじめに

納豆菌の生産する粘質物質の主成分であるポリ - γ - グルタミン酸 (PGA) は、納豆の旨みの素となるだけでなく、材料としても非常に興味深い。その理由を以下にまとめる。

体内に取り込んでどのような拒否反応も起こさないなど、生体適合性を持つ¹⁾。

生分解性物質であるため環境負荷が少ない。近年注目されている生分解性プラスチックの基本的な性質を持っているため、生分解性を持たせるために新たな労力を割く必要が全くない。

コラーゲンの代替成分として一部の化粧品等に応用されているほどに、高い保水性を持つ。

カルシウム吸収促進剤として一部の食品にも配合されているように、PGA はカルシウムとの結合能が高い。

食品廃棄物からの生産も可能であり、廃棄物処理の観点からも有用である。当センターにおいても、廃棄される納豆を利用してPGAを抽出、回収することに成功している²⁾。

このように様々な利点を持つ PGA であるが、その一方で PGA は水溶性の物質であるため、上記に挙げられている分野以外では応用されてこなかった。そこで本研究では、PGA の持つこの欠点を克服することを目的とした。具体的には、PGA を他の材料と複合化して水不溶性の物質に変換し、さらに上記性質を活かすことのできる成形性を持つ材料とすることを目標とした。

2. 実験方法

2.1 HPLC による PGA の分析法

PGAは前年度の報告²⁾にあるとおりに調製されたもの、すなわち、グルタミン酸の含有量で51.9%のものを使用した。また、キトサンは中部アサマ化成販売(株)よりの提供品を用いた。PGA及びキトサンの含有量を測定するため、HPLCによる分析を行った。試料約5mgを正確に測り取り、6M塩酸による加熱加水分解の後、pHを4から7に調整して容量を測定した。その後、孔径0.45 μ mのメンブランフィルターにてろ過をして分析試料とした。カラムはNucleosil 100 5C18(ϕ 4.6 $\times$ 250 mm)を用いた。また、移動相はグラジエント法を採用し、A:40 mMリン酸緩衝液(pH 7.8)、B:アセトニトリル、メタノール、水の45:45:10混合液の2種類を図1に示すような勾配をかけて用いた。検出方法としてはo-フタルアルデヒド(OPA)を用いたプレカラム蛍光分析法(Ex 338 nm、Em 390 nm)を採用した。すなわち、0.1% OPA・0.3 Mホウ酸緩衝液(pH10.5)を用意し、分析試料と同量ずつ混合した後、2分経過後にその溶液をHPLCシステムに導入した。

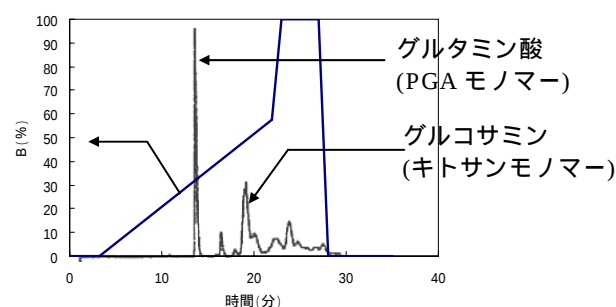


図1 移動相の勾配の様子と典型的なクロマトグラム

HPLC システムは、JASCO (株) 製のものを採用し

た。得られたモノマーの比率をポリマーの比率に換算し、それぞれ PGA 及びキトサンの比率とした。

2.2 アルミノン法によるアルミニウム量の分析

アルミニウムを加えてできた沈殿物中におけるアルミニウムイオンの含有量を測定するため、アルミノン法を採用した。分析方法は次のとおりである。試料約 5 mg を正確に測り取り、塩酸 5 mL に溶解させた後水を加えて 100 mL とした。次いでその試料溶液 30 mL を測り取り、50% 酢酸水溶液を 10 mL 加えた後、アンモニア水にて pH4.0 から 5.6 に調整した。そこへアルミノン緩衝液を 2.5 mL 加え、再度酢酸水溶液で pH4.0 から 5.6 に調整後、室温にて 10 分から 15 分放置し、520 nm の吸光度を測定した。なお、アルミノン緩衝液は、文献にある方法を用いて調製した³⁾。すなわち、酢酸アンモニウム 154 g を水 500 mL に溶かし塩酸 (1 + 4) 25 mL を加え混ぜたものに、アルミノン 0.4 g を少量の水に溶かし加え、アラビアガム 1 g も少量の水に溶かし混ぜ合わせ、水を加えて 1 L とした。測定には紫外可視吸光度計 UV - 160A ((株) 島津製作所) を用いた。また、アルミニウム標準液としては、市販の 1000 ppm アルミニウム標準溶液を希釈して 1.0 ppm、1.5 ppm、2.0 ppm、2.5 ppm、3.0 ppm に調整したものを用いた。

2.3 クリープメータによる弾力試験

ゲルの物性を確かめるために、クリープメータによる弾力試験を行った。クリープメータは(株)山電製 RE-3305 を用い、サンプルの高さの 80% まで圧縮を行った後、その圧縮率のままサンプル台を固定したときの応力変化を測定するという方法を用いた。

3 . 実験結果及び考察

3.1 アルミニウムイオンとの複合化

PGA が陰イオン性ポリマーであることを利用して、多価陽イオンであるアルミニウムイオンを含むミョウバンとの複合化を試みた。PGA の 1% 水溶液 5 mL にそれぞれ 2 %、4 %、6 %、8 % に調製したミョウバン水溶液を 5 mL ずつ混合すると、どのミョウバン濃度においても水に不溶性の物質が生成した。各ミョウバン濃度における溶液の pH は 3.3、3.2、3.1、3.0 であり、この pH 範囲では pH の変化による沈殿生成とは考えにくい²⁾ため、図 2 のように複数の PGA の分子と金属イオンが結びつき、水に溶解できないほど大きな塊となったことが沈殿生成の原因と考えられた。

沈殿物を回収し、乾燥重量を測定すると図 3 のようにミョウバン濃度に応じて重量が増加する傾向が見られた。架橋剤としての役割を果たすアルミニウムイオンが増加した結果、より多くの PGA が沈殿するようになったと考えられた。また、沈殿物の組成を調べるためにアルミ

ニウムイオンの定量をアルミノン法を利用して行ったところ、図 4 のようにミョウバンの濃度が増加するにつれてアルミニウムイオンの含有量も増加した。

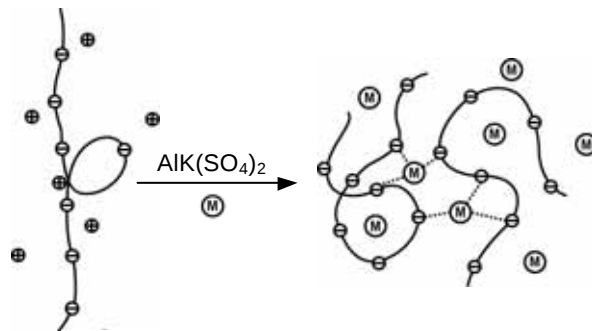


図2 複数のポリマーが金属イオンにより架橋される様子

沈殿物中に含まれる PGA 由来のナトリウムイオンなどの陽イオンがより強いイオン性相互作用を示すアルミニウムイオンに置き換わった結果であると推察された。この結果を利用し、アルミニウムイオン割合と乾燥重量から PGA の回収率を計算すると、図 5 のようにミョウバン濃度が 8% の段階でほぼすべての PGA が回収されていることが判明した。ただし、沈殿物はアルミニウムイオンと PGA のみでできていると仮定した。

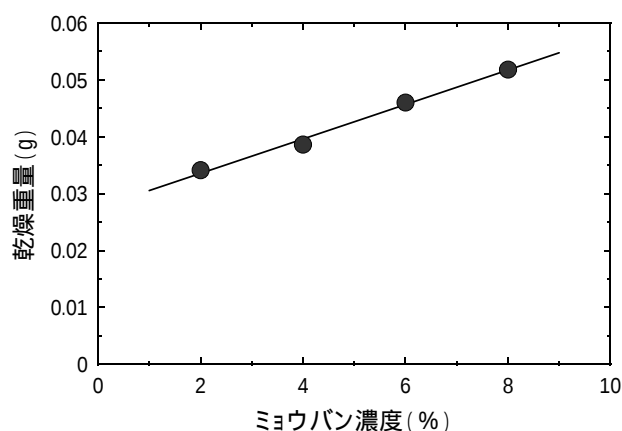


図3 ミョウバン濃度と沈殿物重量の関係

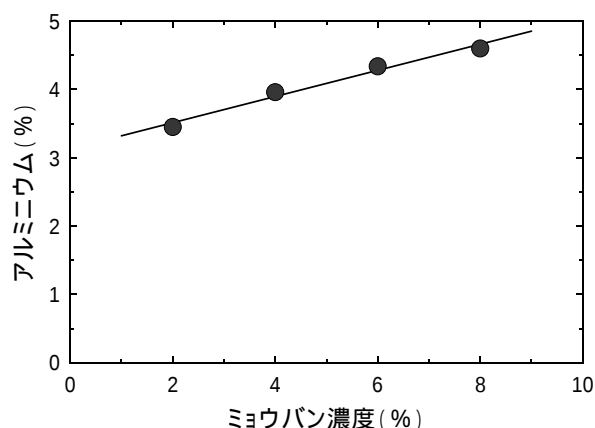


図4 沈殿物中のアルミニウム割合

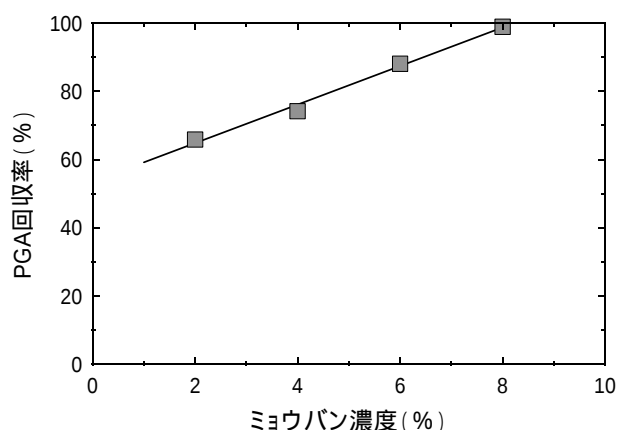


図5 沈殿物のPGA回収率

3.2 キトサンとの複合化

同様の試みとして、陽イオン性ポリマーであるキトサン(図6)との複合化を試みた。PGAの1%水溶液5mLにそれぞれ0.5%、1%、2%、4%に調整したキトサンの4%酢酸水溶液を5mLずつ混合すると、どのキトサン濃度においても水に不溶の物質が生成した。陽イオン性のポリマーが陰イオン性のポリマーであるPGAと結合することで、水に溶解できないほど大きな塊となったものと考えられた。なお、キトサンはエビ由来、カニ由来の2種類を用いたが、どちらを用いた場合にも図7に示すようにキトサンとPGAの混合液から沈殿物が生成し、キトサン濃度に応じて沈殿物の乾燥重量が増加した。陽イオン性のポリマー濃度が増えることで、より多くのPGAが溶解できずに沈殿していると考えられた。

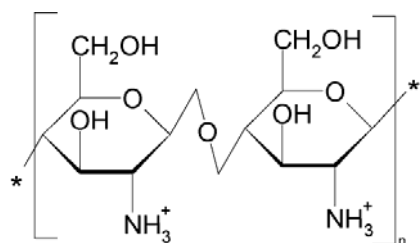


図6 キトサンの構造式

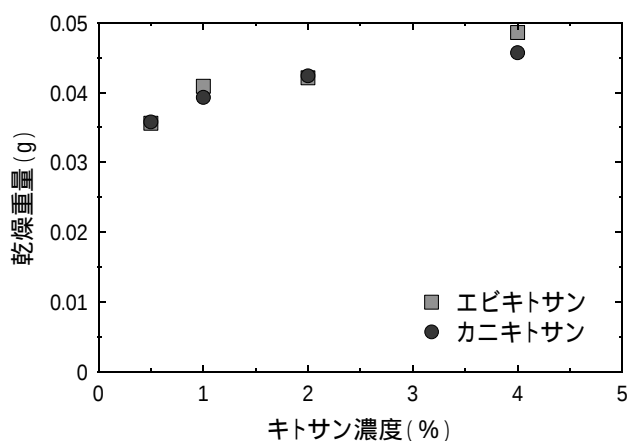


図7 キトサン濃度と沈殿物重量の関係

沈殿物の組成を調べるために沈殿物を加水分解後、HPLCによる分析を行った。結果を図8及び図9に示す。カニキトサン、エビキトサンのいずれの場合においても、沈殿生成時のキトサン濃度によらず、沈殿物中に含まれるキトサンモノマーであるグルコサミン割合は約10%であった。これに対して、沈殿物中のPGAモノマーであるグルタミン酸の割合は、はっきりとした有意差は見られないものの、キトサン濃度が増えるにつれて減少する傾向が見られた。沈殿物の重量と沈殿物に含まれるグルタミン酸の割合からPGAの回収率を計算すると、表1のようになった。用いたPGAの純度を考えると²⁾、加えたPGAのうち、グルタミン酸からできているものについてはほとんど沈殿物として回収できているという結果であった。グルタミン酸量と、グルコサミン量の合計が沈殿物量の半分程度であるのは、PGA由来の不純物が含まれているためと考えられた。

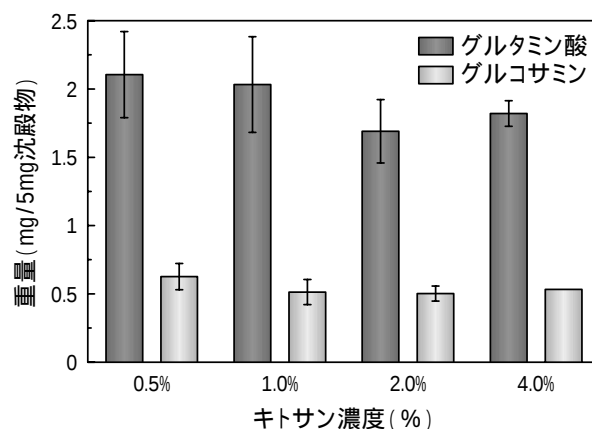


図8 カニキトサンによる沈殿物の組成

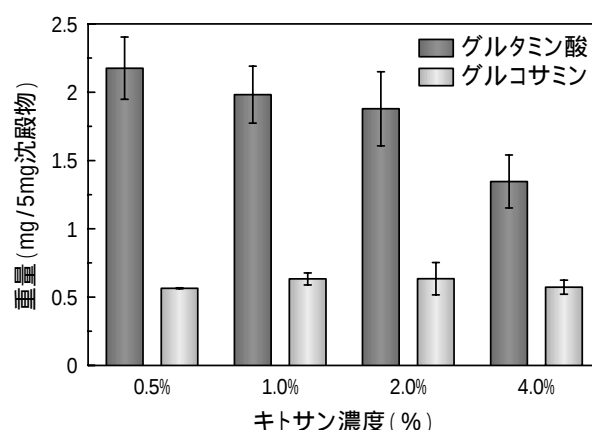


図9 エビキトサンによる沈殿物の組成

表1 キトサンによる沈殿物のPGA回収率 (%)

	0.5%	1%	2%	4%
エビキトサン	56	62	64	66
カニキトサン	56	62	66	70

3.3 ポリペプチド材料への応用

この研究で行った複合化方法では、生成物はすべて粉末状となり、そのままどんな溶媒にも不溶となるため、汎用プラスチック材料として利用することは不可能であった。そこで、複合化の方法を変更することでプラスチック材料としてより利用しやすい形態とすることを目標に、次の実験を行った。

1%PGA 水溶液と2%キトサン水溶液をサンプル管に静かに導入し、そのまま冷凍と解凍を4回から5回繰り返すと、水には不溶であるが、粉末状ではなくノリ状物質に近い水性ゲルが生成した。その写真を図10に示す。水性ゲルは室温で安定的に存在し、再溶解することはなかった。

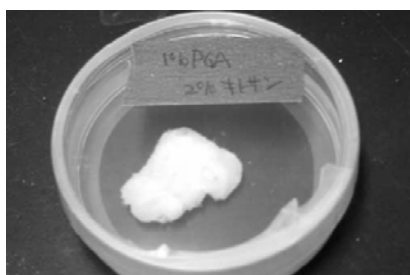


図10 PGA とキトサンの複合水性ゲル

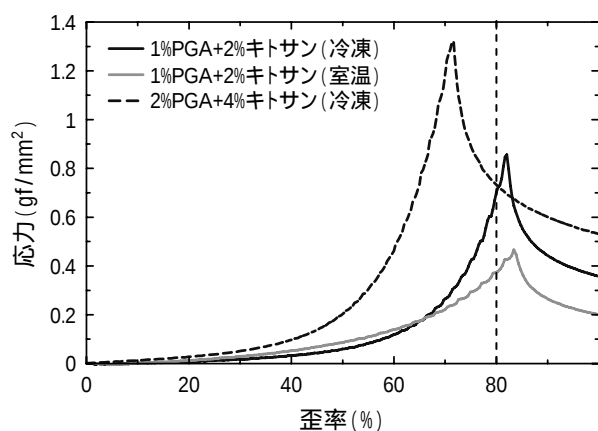


図11 クリープメータによるPGAキトサン複合水性ゲルの応力歪曲線

このゲルの物性を確かめるために、クリープメータによる弾力試験を行った。用意したサンプルは、1%PGA + 2%キトサン（冷凍と解凍を繰り返したもの）、同じ組成で冷凍処理を行わなかったもの、さらに2%PGA + 4%キトサン（冷凍と解凍を繰り返したもの）の3種類である。得られた典型的な応力 - 歪曲線を図11に示す。なお、2%PGA + 4%キトサン（冷凍）のタイプについては、測定装置の測定限界により歪みが70%となるところまでしか圧縮できなかった。

図11からわかるように、いずれの試料に関しても豆腐程度の硬さか、それよりもやや柔らかいものであることが判明した。室温で放置したものは、圧縮初期の応力は変わらないものの、圧縮後期に応力の上昇に耐えられず、全体が崩れてしまうものができていることが判明した。これに対して、冷凍と解凍を繰り返したものについては比較的応力の上昇に耐えられるものができているため、今後はさらに条件を検討してより強度の高いものを目指すとともに、プラスチック材料としての応用分野を検討する予定である。

4. 結び

PGAは、陽イオン性物質との複合化により水に不溶性となることが判明した。沈殿物は、加えるアルミニウムイオンやキトサンの濃度が高いほど多かった。沈殿物中のアルミニウム濃度は沈殿生成時のアルミニウム濃度に依存したが、キトサンで沈殿させた物質については、キトサン濃度に依存しなかった。また、PGAとキトサンの混合の方法において、室温で放置したものと異なり、冷凍と解凍を繰り返す方法を採用することで、ノリ状物質に近い柔らかい水性ゲルを形成することが判明した。

文献

- 1) 芦内誠：化学と生物，40（4），212（2002）
- 2) 近藤正夫：愛知県産業技術研究所研究報告，3，118（2004）
- 3) 日本化学会編：実験化学講座 15 分析化学（下）P70(1958)，丸善

